

**ÜBER DAS FREIE UND GEBUNDENE TESTOSTERON
IM PLASMA VON JUNGEN MIT GYNÄKOMASTIE
UND VON MÄDCHEN MIT PUBERTAS PRAECOX**

Max Grünewald

1979
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0068

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

ÜBER DAS FREIE UND GEBUNDENE TESTOSTERON
IM PLASMA VON JUNGEN MIT GYNÄKOMASTIE
UND VON MÄDCHEN MIT PUBERTAS PRAECOX

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Max Grünewald

aus

Moosburg

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. Dipl.-Biochem.
Frank B i d l i n g m a i e r

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. B e t k e

Dekan: Prof. Dr. W. S p a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1979



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meiner Familie

1. Mein Name ist ...

2. Ich bin ... Jahre alt.

3. Ich bin ... Jahre alt.

4. Ich bin ... Jahre alt.

5. Ich bin ... Jahre alt.

6. Ich bin ... Jahre alt.

Meiner Familie

7. Ich bin ... Jahre alt.

8. Ich bin ... Jahre alt.

9. Ich bin ... Jahre alt.

10. Ich bin ... Jahre alt.

11. Ich bin ... Jahre alt.

12. Ich bin ... Jahre alt.

13. Ich bin ... Jahre alt.

14. Ich bin ... Jahre alt.

15. Ich bin ... Jahre alt.

16. Ich bin ... Jahre alt.

17. Ich bin ... Jahre alt.

18. Ich bin ... Jahre alt.

19. Ich bin ... Jahre alt.

20. Ich bin ... Jahre alt.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. I. Methode der Gleichgewichtsdialyse

B. I. a. Prinzip der Gleichgewichtsdialyse

B. I. b. Die Gleichgewichtsdialyse-Apparatur

B. I. c. Die Dialyse-Membrane

B. I. d. Einlegen der Membranen in die Kammern

Aufbau der Zellenblöcke

B. I. e. Das Füllen und Leeren der Dialysezellen

B. II. Reagenzien und Lösungen

B. II. a. Die verwendeten Reagenzien

B. II. b. Der verwendete Puffer

B. II. c. Herstellung der radioaktiven Steroidlösung

B. III. Die Aufbereitung der Proben

B. III. a. Bestimmung der Radioaktivität der Proben

B. III. b. Berechnung des freien und gebundenen Anteils des Plasmasteroids

B. III. c. Schema des Arbeitsablaufs

B. IV. Vorversuche zur Optimierung der Methode

B. IV. a. Abhängigkeit der Dialyse vom Grad der Plasma- verdünnung

B. IV. b. Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtsdialyse

B. IV. c. Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration
des radioaktiven Steroids

B. IV. d. Abhängigkeit der Dialyse vom pH der Puffer-
lösung und der Temperatur der Badflüssigkeit

B. V. Qualitätskontrolle, Praktikabilität und
Diskussion der Methode

B. V. a. Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie und
Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag

B. V. b. Praktikabilität der Methode

B. V. c. Diskussion der Methode

C. Normalwerte

C. I. Patientenkollektiv

C. II. Jungen

Zahl, Alter, Einteilung

Graphische Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

C. III. Mädchen

Zahl, Alter, Einteilung

Graphische Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

C. IV. Vergleich Jungen mit Mädchen

Graphische Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

- D. Prozentuale Bindung von Plasmatestosteron bei
Jungen mit Gynäkomastie im Vergleich mit ge-
sunden Jungen
Patientenkollektiv
Graphische Darstellung
Statistische Auswertung
- E. Prozentuale Bindung von Plasmatestosteron bei
Mädchen mit Pubertas praecox im Vergleich mit
gesunden Mädchen
Patientenkollektiv
Vergleich graphisch dargestellt
Statistische Auswertung
- F. Besprechung der Ergebnisse
- G. Zusammenfassung
- H. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Die Pubertätsgynäkomastie bei Jungen und die idiopathische Pubertas praecox bei Mädchen gelten als Störung der Entwicklung des Endokriniums (19). Früher nahm man als sicher an, daß eine erhöhte Produktion von Geschlechtshormonen die Ursache für die Symptome sind. Bei Mädchen mit Pubertas praecox wurden tatsächlich erhöhte Gonadotropin- und Östrogenspiegel im Urin gefunden, doch bei der genauen Untersuchung der Östrogene und Gonadotropine im Plasma stellte sich heraus, daß die Hormonspiegel bei Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox weniger stark erhöht waren, als man nach den Symptomen (Brustentwicklung, vaginale Blutung, Knochenreifung) erwarten konnte. Die Hormonkonzentrationen bei Mädchen mit Pubertas praecox liegen deutlich niedriger als die Werte bei normalreifen Mädchen gleicher Entwicklungsstufe (5).

Im Plasma von Patienten mit Pubertätsgynäkomastie wurden von verschiedenen Gruppen (2, 3, 20) weder erhöhte Östrogenspiegel, noch eine Verschiebung des Östrogen-Androgen-Quotienten gefunden. Bisher ist noch unklar, wie die relativ niedrigen Östrogenspiegel die deutliche Feminisierung bewirken. Eine Möglichkeit ist, daß der biologisch aktive Anteil der Androgene dieser Patienten durch Bindung an Proteine erniedrigt ist (2).

SLAUNWHITE et al. (29) und VERMEULEN et al. (34) haben gezeigt, daß nur der freie, nicht proteingebundene Anteil der einzelnen Hormone biologisch wirksam ist. In der Folgezeit wurden Methoden zur Bestimmung dieses freien Hormonanteils wie Gleichge-

wichtsdialyse, Ultrafiltration durch Zentrifugieren und Ultrafiltration im Vakuum entwickelt (11, 24). Von diesen Methoden hat sich die Gleichgewichtsdialyse durchgesetzt, da sie einerseits gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, andererseits sicher und relativ einfach zu handhaben ist.

In der Kinderheilkunde fand diese Methode nur vereinzelt Anwendung (12). Bei Kindern erfordert sie wegen der niedrigen endogenen Hormonspiegel relativ große Plasmamengen, die schwer zu gewinnen sind. Seit kurzer Zeit jedoch steht ein Gerät zur Verfügung, das eine Gleichgewichtsdialyse für Sexualhormone mit Plasmamengen im μ l-Bereich ermöglicht (9). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Bestimmung des freien und proteingebundenen Anteils von Testosteron bei gesunden Jungen und Mädchen sowie bei Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox und bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie.

B. I. Methoden der Gleichgewichtsdialyse

B. I. a. Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse

Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse (10, 29) besteht darin, daß gelöste niedermolekulare Substanzen in freier Form durch eine semipermeable Membrane diffundieren können, während sie an höhermolekulare Substanzen gebunden, durch diese Membrane zurückgehalten werden. Die niedermolekularen Substanzen können sowohl anorganische Stoffe wie Eisen und Kupfer, als auch organische Verbindungen wie die Sexualhormone, das Cortisol und die Schilddrüsenhormone sein. Bei den höhermolekularen Verbindungen handelt es sich um Plasma-Albumin und um β -Globulinfraktionen wie Transferrin, Coeruloplasmin, Sexualhormon bindendes Globulin, Transcortin und Thyreoglobulin. Die Diffusion der freien niedermolekularen Substanzen durch die Membrane erfolgt so lange, bis ein Gleichgewichtszustand zwischen den freien Molekülen auf beiden Seiten der Membrane erreicht ist. Der Gleichgewichtszustand ist abhängig von den Affinitäten, die der niedermolekulare Stoff zu der höhermolekularen Verbindung besitzt. Beschrieben wird diese Diffusion durch das 1. Fick'sche Gesetz: Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichts ist von der Membranfläche, dem Konzentrationsgradienten und dem Diffusionskoeffizienten abhängig, wobei dieser eine Funktion der Temperatur und der Art der niedermolekularen Substanz ist. Bei der Bestimmung des gebundenen Anteils des Plasma-Testosterons befindet sich auf der einen Membranseite radioaktives Testosteron in Pufferlösung und auf der anderen Seite endogenes Testosteron in der Plasmaprobe.

Im Plasma liegt das Sexualhormon bindende Globulin (SHBG) vor, das mit unterschiedlicher Affinität Sexualhormone bindet.

Mercier Bodard (21) fand Assoziationskonstanten von $K = 1,2 \cdot 10^{-9}$ bzw. $0,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ für Testosteron und Östradiol. Testosteron wird also rund doppelt so stark wie Östradiol an das Globulin gebunden. Zum Austausch durch die Membrane stehen auf der einen Seite das freie Testosteron der Plasmaprobe, auf der anderen Seite zugefügtes radioaktiv markiertes Testosteron im Puffer zur Verfügung. Der Austausch erfolgt so lange, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den freien Testosteronanteilen in den beiden durch die Membran getrennten Kammern eingestellt hat.

B. I. b. Die Gleichgewichts-Dialyse-Apparatur

Für die Plasma-Dialyse zur Bestimmung des freien Hormonanteils standen nur relativ geringe Mengen an Plasma zur Verfügung, da Kleinkindern die Abnahme größerer Blutmengen nicht zumutbar ist und andere Untersuchungen mit höherem Plasmabedarf, so zum Beispiel die Messung der absoluten Hormonkonzentrationen, der Dialyse vorausgegangen sind.

Die Dianorm Apparatur wurde für die folgenden Untersuchungen gewählt, da mit ihr eine Dialyse mit geringen Plasmamengen möglich ist.

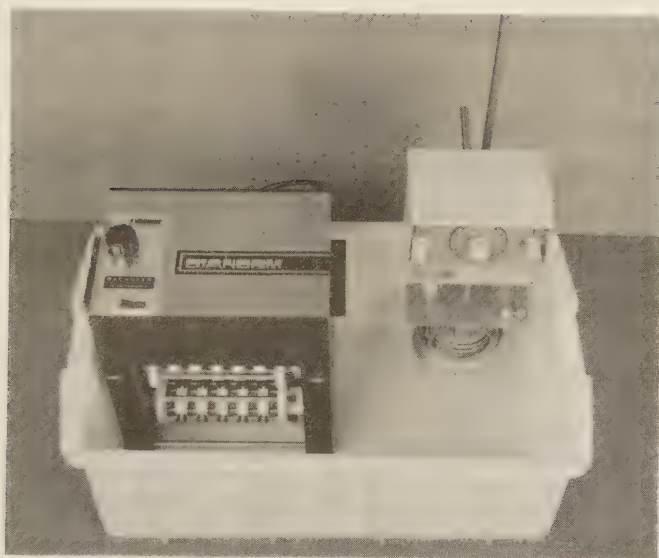


Abb. 1 Das Dianorm-Gerät der Fa. Bachofer, Reutlingen

Bei dem System trennt die semipermeable Membrane eine Dialyse-Zelle aus Teflon in zwei Zellenhälften. Bei den für die Testosteron-Untersuchung gewählten Zellen beträgt das Dialysevolumen je Zellenhälfte 200 μ l. Fünf Dialyse-Zellen bilden zusammen einen Zellenblock. Vier derartige Zellenblöcke können gleichzeitig in eine Apparatur eingesetzt werden, die durch einen Elektromotor angetrieben, die Zellenblöcke alle mit gleicher Geschwindigkeit rotieren läßt. Es können also mit dem Gerät 20 Bestimmungen nebeneinander durchgeführt werden.

Um die Dialyse bei konstanter Temperatur von 37°C ausführen zu können, wird das Dianorm-Gerät in ein thermostatisiertes Wasserbad gestellt. Durch schonende Rotation von 5 bis 10 Umdrehungen pro Minute um eine Achse senkrecht zur Membrane werden die

Lösungen durchmischt, so daß sich das Diffusionsgleichgewicht rasch einstellen kann.

Bereits nach 10 min. ist bei dem Gerät ein nahezu vollständiger Wärmeaustausch zwischen Wasserbad und Kammerinhalt erreicht.

B. I. c. Die Dialyse-Membran

Als Dialyse-Membran eignet sich der Spectrapor-Cellulose Membranschlauch der Firma Spectrum, Medical industries, INC, Los Angeles 90054. Die Porengröße der Membranschlauchs, aus dem für die Versuche entsprechend große Quadrate geschnitten werden, wurde so gewählt, daß Moleküle bis zu einem Molekulargewicht (MG) von 12 - 14 000 durchtreten können. Somit ist sichergestellt, daß das SHBG, das der Albuminfraktion des Plasmas angehört und ein MG von rund 52 000 aufweist, nicht die Membrane durchdringen kann, während der Austausch des Testosterons (MG 288) in beide Richtungen rasch erfolgt.

Das Absorptionsverhalten der Membrane dagegen spielt bei der Plasmadialyse keine wesentliche Rolle. Es kann vorausgesetzt werden, daß die Zellenhälften und Membranseiten, die die gleiche Oberfläche und Form besitzen und aus gleichem Material bestehen, auch dieselbe Menge an Dialysatbestandteilen absorbieren und somit das Ergebnis nicht beeinflussen.

Dagegen ist eine sorgfältige Vorbehandlung der Membranen von großer Bedeutung. Es müssen eingelagerte Verunreinigungen ent-

fernt werden, um von dieser Seite aus störende Effekte auf die Bestimmung der freien Testosteron-Moleküle auszuschalten. Es wurde daher streng nach folgender Vorschrift (10) verfahren:

1. Vorwaschen mit dest. Wasser ca. 15 Minuten lang, Wasser 10 mal dekantieren.
2. Einlegen der Membranen in 25 - 30 %-iges Äthanol (siehe Materialliste, B. II. a.) genau 10 Minuten (zu langes Einlegen in Äthanol führt bei der verwendeten Cellulosemembran zu Schrumpfungen und unkontrollierten Porenverengungen).
3. Auswaschen mit dest. Wasser 20 Minuten, dabei 10 mal Wasser abgießen.
4. Quellen und Sättigen der Membrane im Dialyse-Puffer (siehe B. II. a.) 15 Minuten.
5. Puffer anschließend erneuern.

Die Membranen können nach diesem Vorgang im Puffer über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

B. I. d. Einlegen der Membrane in die Kammern

Aufbau der Zellenblöcke

Durch Abtropfen werden die Membranen von überschüssigem Lösungsmittel befreit, auf die Zellenhälfte B (siehe Abbildung 2) gelegt und leicht gespannt. Es ist darauf zu achten, daß die Membranen nicht fest getrocknet werden (kein Filterpapier benutzen), da sie sonst wellig werden und an der Teflonkammer anhaften.

Das Einfüllen der Kammern gelingt dann nicht mehr vollständig. Man preßt die Zellenhälfte A mit der Dichtung auf die Zellenhälfte B mit der daraufliegenden Membrane und bringt die Einfüllöffnungen durch gegenseitiges Verdrehen der Kammern zur Deckung. Zum Zusammenbau der Zellenblöcke werden Federadapter zwischen die Zellen gesteckt und mit Mitnehmer- und Antriebsflansch der Abbildung verschraubt.

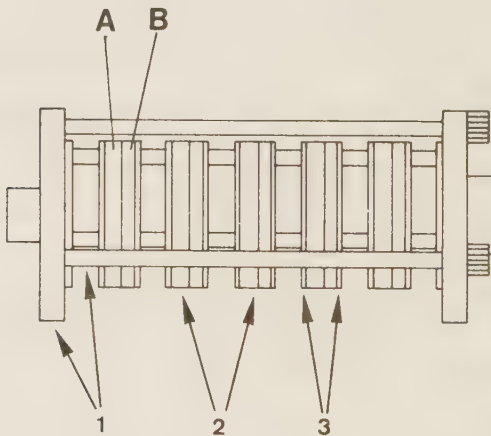


Abb. 2 Schematische Darstellung des Zellenblocks

Der Zellenblock setzt sich aus folgenden Einzelteilen zusammen:

1. Mitnehmer- oder Antriebsflansch mit drei Distanzstangen,
2. 5 Dialysezellen aus Teflon, bestehend aus
Deckel (B) und Gehäuse (A) mit eingearbeiteter Dichtung,
3. 6 Feder-Press-Adapttern
ferner einem Lagerflansch und drei Rändelmuttern.

B. I. e. Das Füllen und Leeren der Dialysezellen



Abb. Nr. 3 Füllstativ mit eingespanntem Zellenblock

Zum Füllen befinden sich auf der Oberseite der Dialyse-Zellen je Zellenhälfte zwei Bohrungen, die sich mit Stopfen verschlies-

sen lassen: Eine Bohrung dient zum Füllen, die andere zur Entlüftung. Der Durchmesser der Bohrungen ist so bemessen, daß die üblichen Größen der Einmalpipetten zum Einfüllen benutzt werden können. Das Einspritzen der Plasmalösungen bewirkt leicht Schaumbildung in den Kammern und kann Teile des Probenmaterials wieder aus dem Entlüftungsloch heraustreiben. Aus diesem Grunde wurde das max. Dialysiervolumen pro Halbzelle von 200 μ l nicht voll ausgenützt. Eine Füllmenge von 150 μ l dagegen konnte ohne Schwierigkeiten in die Kammern gebracht werden. Von Vorteil sind die geringeren Füllmengen außerdem, weil der Mischeffekt des Dialysats besser ist und dadurch die Dialysezeiten kürzer werden. Das minimale Arbeitsvolumen von 125 μ l darf jedoch nicht unterschritten werden, da sonst die Gefahr des Austrocknens der Zellen besteht.

Nach dem Füllen der Zellen ist auf sorgfältiges Verstöpseln der Kammern zu achten, damit nicht der Kammerinhalt durch die Badflüssigkeit verunreinigt wird. Aus den selben Gründen muß später vor dem Entleeren der Kammern der Zellenblock gut abgetrocknet werden.

Die Entleerung der Kammern nach der Dialyse geht folgendermaßen vor sich: Nachdem man den Zellenblock in das Füllstativ eingespannt hat, zieht man, links beginnend, zuerst den Entleerungsstöpsel an der Unterseite der ersten Halbzelle, hält unter das Entleerungsloch ein ausgeglühtes (16) Halbmikro-Reagenzglas und entfernt den entsprechenden Entleerungsstöpsel auf der Oberseite. Mit einer 500 μ l Einmal-Pipette drückt man Luft in die Kammer und treibt das Dialysat durch die Entleerungsbohrung in das

daruntergehaltene Reagenzglas. Die drei anderen Stöpsel der Kammer auf der Oberseite dürfen beim Entleeren vorher nicht gezogen werden. Es entsteht sonst kein Überdruck in der Kammer und gelegentlich vorhandene Fibringerinnsel können nicht durch die feine Entleerungsbohrung gepreßt werden. Weiterhin ist darauf zu achten, daß vor dem Entleeren der nächsten Zellenhälfte die Kammerunterseite von evtl. noch anhaftendem Dialysat zu reinigen ist.

Reinigung der Kammern

Nach dem Ausfüllen des Dialysats zerlegt man die Zellenblöcke durch Entfernen der Rändelmutter und entnimmt die nun radioaktiv kontaminierten Membranen mit einer Pinzette. Hierbei und bei der anschließenden Säuberung der Teflonkammern muß ein Verkratzen der Zellen und besonders des Dichtungsringes auf der Zellenhälfte A vermieden werden. Zur Reinigung spült man die Kammern zuerst mit destilliertem Wasser, dann zweimal mit Aceton (siehe Materialliste B. II. a.) und trocknet die Kammern an der Luft. Aus den Füll- und Entleerungsbohrungen läßt sich das Wasser-Aceton-Gemisch mit Druckluft herausblasen.

Bei der Kontrolle des Reinigungsverfahrens wurde keine Restaktivität mehr gefunden.

B. II. Reagenzien und LösungenB. II. a. Die verwendeten Reagenzien

1. Radioaktiv markiertes Testosteron (1,2 -
- ^3H
- Testosteron)

Fa. AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig

spezifische Aktivität 58 Curie/mmol

entspr. 201 mCi/mg

Die Lösung wurde über Sephadex LH 20 mit Benzol:

Äthanol (95:5) als Laufmittel gereinigt;

2. Benzol: Nr. 1783 Benzol p.a. MERCK Darmstadt
3. Aceton: Nr. 14 rein MERCK Darmstadt
4. Äthanol: Nr. 8006 Äthanol p.a. BAKER, D 608 Groß-Gerau
5. Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4 p.a. Nr. 4873 MERCK Darmstadt
6. Natriumazid NaN_3 Nr. 6688 MERCK Darmstadt
7. Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Nr. 6580
MERCK Darmstadt
8. Methanol rein Nr. 6006 MERCK Darmstadt
9. Dioxan reinst Nr. 3115 MERCK Darmstadt
10. PPO = (2,5-Diphenyloxazol) Fa. ZINSSER Frankfurt (Main)
11. POPOP = 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzol Fa. ZINSSER
12. Gammaglobulin vom Rind, trocken, rein BEHRINGWERKE Marburg
14. Naphthalin für Szintillationsmessungen, MERCK Darmstadt

Alle Lösungen, bei denen Wasser vorgeschrieben war, wurden mit Aqua destillata pro injektionen DAB 7 angesetzt.

B. II. b. Der verwendete Puffer

Für alle Lösungen und Verdünnungen wurde folgender Puffer verwendet:

Puffer pH 7,2 : 2,686 g KH_2PO_4
 8,356 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 0,325 g NaN_3
 1,0 g γ - Globulin
 Aqua bidest. ad 1000 ml

B. II. c. Herstellung der radioaktiven Testosteronlösung in Puffer:

Bei den Untersuchungen wurde immer von einer sog. Stammlösung ausgegangen, die etwa 300 ng markiertes Testosteron in 100 ml Puffer enthielt.

Die Originalampulle enthielt 250 μCurie ; der Ampulleninhalt war mit Benzol auf 50 ml gebracht worden, um die Selbstzerstrahlungsrates herabzudrücken. Bei einer spezifischen Aktivität von 58 Ci/mmol und einem MG von 288 entsprechen 250 μCurie 1500 ng Testosteron, enthalten in 50 ml Lösung. Von dieser Lösung des Testosteron in Benzol wurden 5 ml auf dem Wasserbad bei 37° C zur Trockne eingedampft und in 50 ml Puffer aufgenommen. Bei Bedarf wurde die Stammlösung verdünnt. Diese Lösung konnte im Schliffkolben bei 4° C einen Monat aufbewahrt werden. Sie enthielt 30×10^3 cpm (counts per minute), bzw. 450 pg ^3H -Testosteron in 150 μl .

B. III. Die Aufbereitung der Proben

B. III. a. Bestimmung der Radioaktivität der Proben

Die nach B.I.e. gewonnenen Dialysate wurden zur Bestimmung der Radioaktivität aus den Glasröhrchen in Zählgefäße pipettiert, die von der Firma ZINSSER, Frankfurt bezogen wurden. Bei der Entleerung der Kammern konnte nicht der gesamte, ursprünglich einpipettierte Inhalt gewonnen werden. Ein Teil des Dialysats blieb immer entweder an den Kammerwandungen oder an der Membrane haften. Dagegen konnte man immer mit Sicherheit 50 μ l ausfüllen. Die 50 μ l wurden in die Zählgefäße einpipettiert, die mit ca. 10 ml der Dioxan-Szintillatorflüssigkeit gefüllt waren.

Zusammensetzung der Dioxan-Szintillatorflüssigkeit

200,0 Naphthalin

40,0 PPO

0,6 POPOP

ad 2000 Dioxan

Nach dem sorgfältigen Verschließen und Kennzeichnen der Zählröhrchen wurden sie je 10 sec maschinell kräftig durchgeschüttelt.

Für die Bestimmung der Radioaktivität in cpm standen ein Flüssigkeitszintillationszähler der Firma PACKARD, Modell Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer 3320 sowie das Gerät BF Betaszint 5000 der Firma BERTHOLD, 7547 Wildbad zur Verfügung.

Die Zählausbeuten der Geräte bezüglich Tritium markierter Substanzen lagen bei dem verwendeten Szintillator bei 40 %.

Um Zählfehler möglichst gering zu halten, wurde die Zähldauer für alle Proben mit 20 min festgelegt. Die Werte der Proben lagen zwischen 30 und 20.000 cpm je nach Art der Probe.

B. III. b. Berechnung des freien und gebundenen Anteils des Plasmatestosterons

Der prozentuale Anteil des gebundenen Steroids läßt sich durch Messung der Radioaktivität bestimmen und wird nach der Formel von SLAUNWHITE (29) berechnet:

$$\% \text{ gebundenes Steroid} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\text{cpma} \cdot \text{Volb}}{\text{cpmb} \cdot \text{Vola}} \right]$$

Dazu werden aus den beiden Zellenhälften A und B einer Dialysierkammer die zwei Dialysate a und b gewonnen.

a = Dialysat aus der Zellenhälfte, in die das radioaktive, puffergelöste Steroid eingefüllt wurde.

b = Dialysat aus der Zellenhälfte, in die das verdünnte Plasma einpipettiert wurde.

Da immer dieselben Volumina, nämlich 500 µl von a und b in die Zählröhrchen überführt wurden, kann die Berücksichtigung der Volumina entfallen. Die Formel von SLAUNWHITE vereinfacht sich dann:

$$\% \text{ gebundenes Steroid} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\text{cpma}}{\text{cpmb}} \right]$$

B. III. c. Schema des Arbeitsablaufs

In Abbildung 4 ist der Ablauf der Gleichgewichtsdialyse noch einmal zusammengefaßt dargestellt.

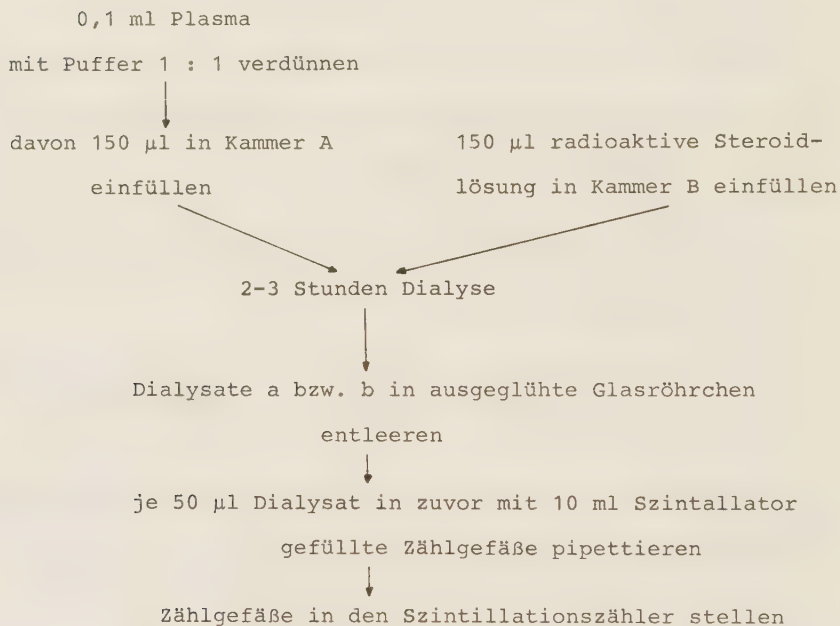


Abb. 4 Schematische Darstellung der Gleichgewichtsdialyse
von Testosteron

B. IV. Vorversuche zur Optimierung der Methode

B. IV. a. Abhängigkeit der Dialyse vom Grad der Plasmaverdünnung

Der Einfluß des Verdünnungsgrades der Plasmaproben auf das Dialyse-Ergebnis wurde an gepooltem Plasma untersucht, das eine Testosteron-Konzentration von 300 ng/dl besaß. Die Verdünnung von Plasmaproben mit dem in B.II.b. beschriebenen Puffer ist aus folgendem Grund notwendig: Führt man die Untersuchungen mit unverdünntem Plasma durch, so muß man auf Grund der onkotischen Druckdifferenz zwischen Plasma und Puffer mit einer Volumenverschiebung durch die Membrane rechnen. FOREST et al. (11) fanden, daß sich das Plasmavolumen durch Zustrom von Puffer um 12 % erhöht. Bei verdünntem Plasma ist diese Volumenverschiebung dagegen viel geringer. Frühere Dialyseversuche wurden deshalb vielfach bei einer Verdünnung von 1 : 5 vorgenommen (11, 12, 25). Da man aber bemüht sein muß, die Konzentration der radioaktiven Lösung möglichst den Konzentrationsverhältnissen des Steroids im Plasma anzugleichen (11), hätte man bei den zu erwartenden niedrigen Testosteron-Spiegeln nur sehr geringe Mengen radioaktiven Testosterons einsetzen können, was zu so niedrigen Zählausbeuten hätte führen müssen, daß die Genauigkeit der Bestimmung stark beeinträchtigt worden wäre.

Um eine geeignete Verdünnung zu ermitteln, wurden vom oben beschriebenen Plasma Verdünnungen in verschiedenen Stufen hergestellt. Die Hormonkonzentrationen der radioaktiven Steroidlösungen wurden den vorher bestimmten Testosteron-Konzentrationen in den

Plasmaverdünnungen angepaßt. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 5 Gleichgewichtsdialysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Dabei wurde der Anteil des protein-gebundenen Testosterons in % angegeben.

Tab. 1 Prozentuale Bindung von Testosteron in Abhängigkeit vom Grad der Plasma-Verdünnung

1	:	1 verdünntes Plasma	$\bar{x} = 95,3 \%$
1	:	5 verdünntes Plasma	$\bar{x} = 93,9 \%$
1	:	10 verdünntes Plasma	$\bar{x} = 89,1 \%$
1	:	25 verdünntes Plasma	$\bar{x} = 74,9 \%$

Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse (Abb. 5) zeigt, daß mit steigender Verdünnung des Plasmas der prozentuale Anteil des gebundenen Steroids konstant abfällt. Für die folgenden Versuche wird eine 1 : 1 Verdünnung gewählt, da diese nur eine geringe Volumenverschiebung verursacht und physiologischen Verhältnissen ähnlich ist.

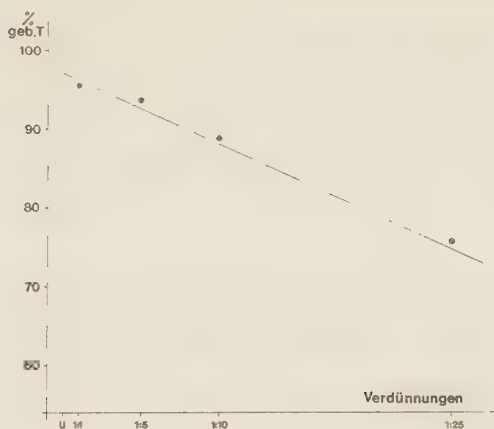


Abb. 5 Abhängigkeit der prozentualen Bindung des Testosterons vom Grad der Plasmaverdünnung

U : unverdünntes Plasma

% geb. T : prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Testosterons

B. IV. b. Abhängigkeit des Gleichgewichts von der Dialysedauer

Aus dem in B.I.a. beschriebenen Prinzip der Gleichgewichtsdialyse geht hervor, daß bei dem Austausch der Steroide durch die Membrane erst nach einer gewissen Zeit ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Die Zeitdauer bis zur Einstellung des Gleichgewichtes hängt neben anderen Parametern (1. Fick'sches Gesetz) auch von der Menge des Dialysiergutes ab. Die genaue

Kenntnis des zeitlichen Verlaufs dieser Gleichgewichtseinstellung ist notwendig, um den Test auf konstante Dauer normieren zu können. Außerdem ist es wichtig zu wissen, ob es nach Einstellung des Gleichgewichtes bei längerer Dialysedauer (zum Beispiel über Nacht) wieder zu einer Abnahme der prozentualen Bindung kommt.

Die Abhängigkeit des Dialysegleichgewichtes von der Zeit wurde wie im Vorversuch mit gepooltem Plasma mit einem Testosteron-gehalt von 300 ng/dl untersucht. Dazu wurde die prozentuale Bindung von Testosteron nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten zwischen einer und zwölf Stunden ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Inkubationsversuche sind in Abb. 6 dargestellt.

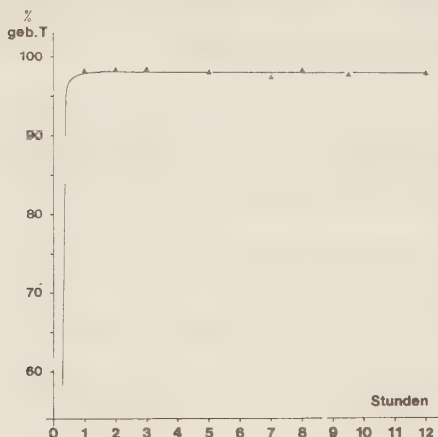


Abb. 6 Abhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung von der Zeit

% geb. T : prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Testosterons

Die Graphik zeigt, daß bereits nach einer Stunde das Gleichgewicht erreicht ist. Auf Grund der raschen Gleichgewichtseinstellung und der lang anhaltenden Plateauphase war es möglich, die Dialysedauer zwischen 2 und 12 Stunden zu variieren. Während dieser Zeitspanne ist eine erneute Abnahme der Bindung - z.B. durch Zerstörung des bindenden Proteins - nicht zu erkennen.

B. IV. c. Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration des radioaktiven Testosterons

Wie in B.IV.a. erwähnt, ist eine wichtige Voraussetzung für ein genaues Dialysen-Ergebnis, daß radioaktives Testosteron in der einen und nicht radioaktives Testosteron in der anderen Halbzelle etwa in gleicher Größenordnung vorliegen. Die absoluten Testosteronspiegel der meisten Plasma kindlicher Probanden waren vor der Dialyse nicht bekannt. Die Menge an radioaktivem Testosteron wurde daher aufgrund grober Schätzungen festgelegt. Beim männlichen Geschlecht ändern sich die Testosteronspiegel im Laufe der Entwicklung von etwa 10 ng/dl bis zu 1000 ng/dl. Um sicher zu sein, daß Unterschiede von einer Zehnerpotenz zwischen der Konzentration von Plasmasteroid und der des radioaktiven Steroids keine Auswirkungen auf die Dialysen-Ergebnisse haben, wurde folgende Untersuchung durchgeführt:

Verwendet wurde gepooltes Adoleszentenplasma mit einem Testosterongehalt von 200 ng/dl. Es wurde mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 100 ng/dl verdünnt und diese Verdünnung in gleiche Portionen aufgeteilt. Vom radioaktiven Steroid wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 5 ng/dl bis 1000 ng/dl hergestellt, die gegen konstante Konzentrationen des Plasmasteroids dialysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2 Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration des radioaktiven Testosterons

Verhältnis von radioaktivem Testosteron zu Plasmatestosteron	Prozentuale Bindung (Mittelwert aus jeweils 4 Bestimmg.)
10 : 1	- 96,6 %
1 : 1	- 97,7 %
1 : 10	- 96,3 %
1 : 20	- 97,1 %

Ergebnis:

Unterschiede innerhalb zweier Zehnerpotenzen zwischen Plasma-steroidspiegel und der Konzentration des radioaktiven Steroids ergeben keine grobe Abweichung. Offensichtlich besteht über einen weiten Bereich keine Abhängigkeit der prozentualen Bindung von der Konzentration des radioaktiven Steroids. Es ist somit gerechtfertigt, die endogenen Testosteronspiegel lediglich nach dem Reifestatus der Patienten abzuschätzen und die radioaktive Standardlösung entsprechend einzustellen.

B. IV. d. Wahl des pH-Wertes der Pufferlösung und der Temperatur des Wasserbades

FOREST und Mitarbeiter (11) konnten in eingehenden Untersuchungen nachweisen, daß die Verwendung von Puffern mit verschiedenen pH-Werten von 6 bis 9 keinen Einfluß auf das Dialyse-Ergebnis haben. Zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ein Puffer

mit einem pH von 7,2 (B.II.b.) gewählt, der dem physiologischen pH des Plasmas nahekommt.

Auch die Temperatur des Wasserbades entsprach mit $37,0 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ physiologischen Verhältnissen. Sie wurde durch ein Thermomix-Gerät der Firma Bender in engen Grenzen konstant gehalten und regelmäßig mit einem Eichthermometer kontrolliert. Die Vergleichbarkeit aller Dialysen von diesem Aspekt aus war sicher gewährleistet.

B. V. Qualitätskontrolle, Praktikabilität und Diskussion der Methode

B. V. a. Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie und von Tag zu Tag

Die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie wurde mit gepooltem Männerplasma mit einem absoluten Testosterongehalt von etwa 400 ng/dl bestimmt. Es wurden 20 Dialysen in einem Absatz gleichzeitig durchgeführt. Die Bindung von Testosteron betrug $94,6 \% \pm 0,37$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Es ergab sich ein Variationskoeffizient von 0,4.

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde mit dem gleichen Plasma an 17 verschiedenen Tagen in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Bindung von Testosteron betrug im Mittel 93,9 % mit einer Standardabweichung von 0,6 % bei einem Variationskoeffizienten von 0,6.

B. V. b. Praktikabilität der Methode

Die Methode ermöglicht die Doppelbestimmung von 10 Patientenplasmen pro Tag, durchgeführt von einer Person.

Das Vorbereiten der Membranen und der Plasmen, sowie das Füllen der Kammern benötigen rund zwei Stunden. Die Dauer der Dialyse ist mit etwa drei Stunden zu veranschlagen (vergl. B.IV.b. Zeitabhängigkeit der Dialyse). Das Entleeren der Dialysekammern, das Überführen der Dialysate in die Zählröhrchen und das Reinigen der Apparatur nehmen nochmals ca. eineinhalb bis zwei Stunden in Anspruch. Das Gerät kann während der dreistündigen Dialyse unbeaufsichtigt laufen. Verdunstete Badflüssigkeit muß nach jeder Dialyse ersetzt werden.

B. V. c. Diskussion der Methode

Vergleicht man den Zeitaufwand dieser Dialysemethode mit dem anderer Verfahren gleichen Prinzips (11, 25), so stellt man fest, daß wegen der geringen Dialysiermengen die Dialysezeiten erheblich kürzer sind (3 Stunden gegenüber 8 Stunden). Das Füllen und Entleeren der Kammern ist wesentlich einfacher und sicherer als das Arbeiten mit Dialysierschläuchen. Diese werden beim Füllen und Entleeren sehr leicht beschädigt oder können während der Dialyse platzen. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen konnten wir auf eine spezielle Extraktion des Steroids aus dem Plasma nach der Dialyse verzichten, da das radioaktive Steroid nur auf ein geringes Dialysatvolumen verteilbar war und sowohl die wäßrige Phase als auch das Steroid selbst durch den Dioxan-Szintillator aufgenommen werden. Weiterhin ist bei der beschrie-

benen Methode von Vorteil, daß die Dialyse im geschlossenen System erfolgt und Verdunsten von Dialysat unmöglich ist. Die Genauigkeit der Methode ist der anderer Methoden vergleichbar (11, 12). Wegen des geringen notwendigen Probenvolumens erlaubt die Methode auch Untersuchungen an Kleinkindern, denen größere Blutabnahmen nicht zuzumuten sind.

C. Proteinbindung von Plasma-Testosteron unter physiologischen Bedingungen

C. I. Auswahl der Probanden und Gewinnung der Plasmen

Untersucht wurden Plasmen von 74 Jungen im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren und von 62 Mädchen im Alter von 4 Monaten bis 12 Jahren. Die Plasmaproben der Kinder bis zum 14. Lebensjahr stammten aus der Universitätskinderklinik München, die der Jungen vom 14. bis zum 16. Lebensjahr aus den Chirurgischen Abteilungen der Kreiskrankenhäuser Freising und Moosburg. Es wurden nur Plasmen von Patienten untersucht, die nicht an endokrinen Erkrankungen litten oder deren Erkrankung oder Therapie das Endokrinium nicht beeinflusste. Die Blutproben wurden tagsüber zwischen 7^{30h} und 17^{00h} in heparinisierte oder EDTA-beschichtete Röhrchen abgenommen. Die Plasmen wurden bis zur Bestimmung bei - 20° C aufbewahrt. Daß das Einfrieren die prozentuale Bindung der Sexualhormone nicht beeinflusst, war von FOREST et al. früher nachgewiesen worden (11). Sie hatte keine Veränderungen der Bindung gefunden, wenn das Plasma mehrere Male eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Trotzdem wurden für die vorliegende Arbeit die Plasmen, die öfters untersucht werden sollten, wie z.B. zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse von Tag zu Tag (B.V.a.) in entsprechende Mengen aufgeteilt und in Kunststoffröhrchen eingefroren.

C. II. Proteinbindung von Plasmatestosteron bei Jungen

Der prozentuale Anteil gebundenen Testosterons wurde bei 74 Jungen im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren ermittelt. Die Jungen wurden in verschiedene Gruppen unterteilt. Gruppe 1 umfaßte 24 Jungen im Alter von 2 bis 6 Jahren und Gruppe 2 39 Jungen von 7 - 16 Jahren. Die Unterteilung in diese beiden Gruppen erfolgte wegen des Auftretens der Adrenarche um das 8. Lebensjahr (26, 28, 18). Von diesem Zeitpunkt an ändern sich die Plasmaspiegel der von der Nebennierenrinde produzierten Geschlechtshormone. In die 3. Gruppe wurden Jungen bis zum Ende des 2. Lebensjahres aufgenommen, da die Sexualhormonspiegel sowohl bei den Jungen als auch bei Mädchen deutlich von den späteren präpubertären Verhältnissen abweichen (4). Die für die jüngste Altersgruppe gewonnenen Werte der prozentualen Bindung des Testosterons wurden zwar in Abbildung 7 eingetragen, für eine statistische Auswertung aber standen zuwenig geeignete Probanden zur Verfügung.

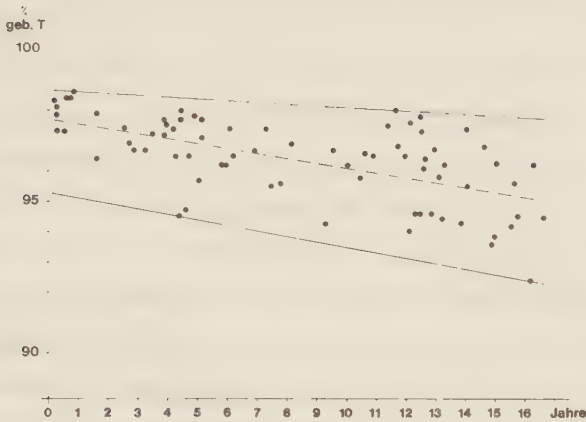


Abb. 7 Prozentuale Bindung von Testosteron (% geb. T)
bei gesunden Jungen in Abhängigkeit vom Alter

———— 5. und 95. Perzentile
- - - - - Regressionsgerade

Der prozentual gebundene Anteil des Plasma-Testosterons in Abhängigkeit vom Alter geht aus Abb. 7 hervor. Die Werte streuen in einem Bereich von 92,8 - 98,8 %. Insgesamt läßt sich eine Abnahme der Testosteronbindung mit zunehmendem Alter erkennen. Bei der Gruppe der 2- bis 6 jährigen Jungen ergibt sich ein Mittelwert von 96,8 %, bei 7- bis 16 jährigen Jungen beträgt die Bindung im Mittel 95,7 %. Der Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen ergibt eine Differenz von etwa 1 %. Dieser Unterschied ist nach dem Student-t-Test signifikant ($2p < 0,01$). Durch die Werte läßt sich eine Regressionsgerade mit einer Neigung von $\tan \alpha = -0,16$ ($\alpha = -9^\circ$) legen. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,6 bei einer Fallzahl von 63.

C. III. Proteinbindung von Testosteron bei gesunden Mädchen

Der prozentuale Anteil gebundenen Testosterons wurde bei 62 Mädchen im Alter von 4 Monaten bis 12 Jahren bestimmt. Unterteilt wurden die weiblichen Probanden unter Berücksichtigung der Adrenarche wieder in verschiedene Gruppen. Die Gruppe 1 umfaßt 25 Mädchen von 2 bis 6 Jahren, die Gruppe 2 32 Mädchen von 7 bis 12 Jahren. Bei den Mädchen wurden Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres aus den vorher genannten Gründen nicht in die statistische Auswertung aufgenommen, die gewonnenen Werte aber sind in die Abbildung 8 eingetragen.

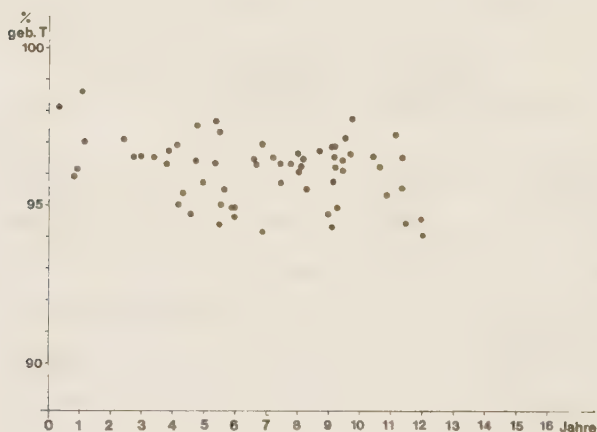


Abb. 8 Prozentuale Bindung von Testosteron (% geb. T) bei gesunden Mädchen in Abhängigkeit vom Alter.

Bei Mädchen zeigen graphische Auswertung und Statistik keine Änderung des prozentual gebundenen Testosterons mit zunehmendem Alter. Die Werte der Proteinbindung bei Mädchen in Abhängigkeit vom Alter sind in Abbildung 8 dargestellt. Sie liegen bei 2- bis 12 jährigen in einem Bereich von 94,0 % bis 97,7 %. Bei der Gruppe der 2- bis 6 jährigen Mädchen ergibt sich ein Mittelwert von 95,9 %, bei den 7- bis 12 jährigen Mädchen ein solcher von 96,0 %. Die Mittelwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich praktisch nicht. Der t-Test nach Student ergibt keinen signifikanten Unterschied ($2p > 0,01$). Die Regressionsgerade zeigt mit einer Steigung von $\tan \alpha = -0,06$ ($\alpha = -3^\circ$) einen nur geringen Abfall mit zunehmendem Alter. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,19 bei einer Fallzahl von 56.

C. IV. Vergleich der Proteinbindung von Plasma-Testosteron bei gesunden Jungen und Mädchen

An Hand der Plasma-Proben von 48 Jungen und 57 Mädchen bis zum Alter von 12 Jahren wurde die prozentuale Bindung von Testosteron bei beiden Geschlechtern verglichen (Abb. 9)

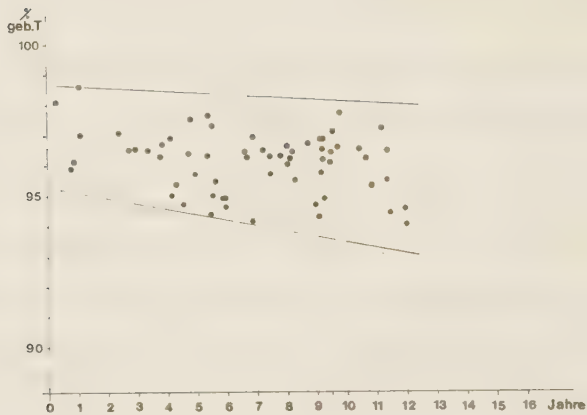


Abb. 9 Vergleich der prozentualen Bindung von Testosteron
(% geb. T) im Plasma von gesunden Jungen und Mädchen
in Abhängigkeit vom Alter.

Fläche zwischen beiden Linien: Bereich der Bindungs-
werte der Jungen

Punkte: Individuelle Werte der Proteinbindung von
gesunden Mädchen

Die Bindungswerte der 2- bis 12 jährigen Mädchen liegen zwar alle im Normbereich gleichaltriger Jungen, doch liegt der Mittelwert der Mädchen (96,0 %) um 0,5 % unter dem der Jungen (96,5 %). Der t-Test nach Student zeigt, daß dieser Unterschied signifikant ist ($2p < 0,01$). Die abfallende Regressionsgerade der Jungen ($\alpha = -9^\circ$) kreuzt die fast waagrechte der Mädchen ($\alpha = -3^\circ$).

D. Proteinbindung von Testosteron bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie im Vergleich mit gesunden Jungen

In der Studie wurden die Plasmen von 20 Patienten mit Pubertätsgynäkomastie im Alter von 10 bis 16 Jahren untersucht und mit den Plasmen von 33 gleichaltrigen gesunden Jungen verglichen. Der Durchmesser des Drüsenkörpers der stärker betroffenen Brust dieser Patienten war auf 3 - 10 cm vergrößert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

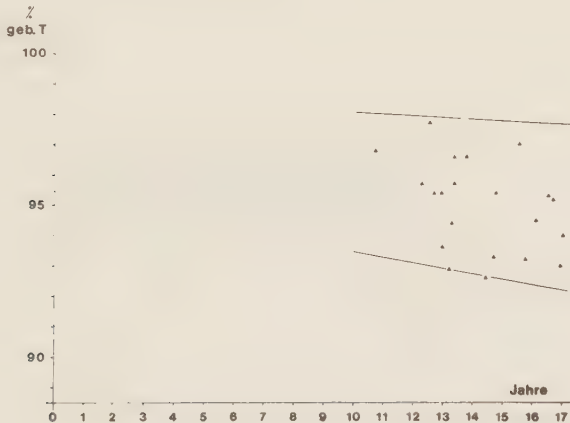


Abb. 10: Prozentuale Bindung von Plasma-Testosteron (% geb. T) bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie im Vergleich mit gesunden Jungen.

Fläche zwischen beiden Linien: Bereich der Bindungswerte der gesunden Jungen

Punkte: Individuelle Werte der Proteinbindung von Jungen mit Pubertätsgynäkomastie

Alle Werte der Patienten mit Gynäkomastie liegen im Normbereich der entsprechenden Altersgruppe. Beim Vergleich der arithmetischen Mittelwerte zeigen die Jungen mit Pubertätsgynäkomastie zwar eine um 0,8 % geringere Bindung, der Student-t-Test bringt für die beiden Gruppen jedoch keinen signifikanten Unterschied ($2p > 0,01$).

E. Proteinbindung von Plasma-Testosteron bei Mädchen mit Pubertas praecox vera im Vergleich mit gesunden Mädchen

Untersucht wurden die Plasmen von 30 Patientinnen mit idiopathischer Pubertas praecox im Alter von 9 Monaten bis zum Alter von 11 Jahren. Die meisten Mädchen wiesen ein Brustentwicklungsstadium zwischen Stadium II und Stadium III nach Tanner (31) auf. Nur bei einigen wenigen war Stadium IV festzustellen. Die Werte sind im Vergleich mit dem Normbereich dieser Altersstufe in Abbildung 11 dargestellt.

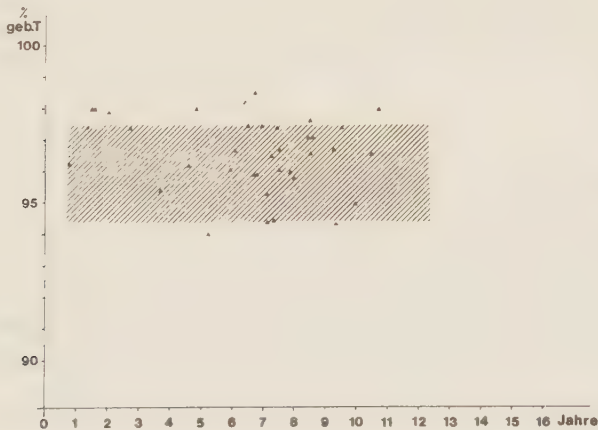


Abb. 11: Prozentuale Bindung von Plasma-Testosteron (% geb. T) bei Mädchen mit Pubertas praecox vera im Vergleich mit gesunden Mädchen

schrattierte Fläche: Bereich zwischen der 5. und 95. Perzentile der prozentualen Bindung von Testosteron bei gesunden Mädchen

Punkte: Individuelle Werte der Proteinbindung von Mädchen mit Pubertas praecox

Während nur ein Wert der Patientinnen deutlich unter der 5. Perzentile liegt, gehen sieben Werte deutlich über die 95. Perzentile hinaus. Die innerhalb des Normbereichs befindlichen Werte werden meist in der oberen Hälfte gefunden. Nach dem Student-t-Test ist die Bindung des Testosterons in der Gruppe der Mädchen mit Pubertas praecox signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe ($2p < 0,01$).

F. Besprechung der Ergebnisse

Die im Plasma gemessenen Konzentrationen der meisten Steroidhormone geben nur einen ungefähren Anhalt für deren tatsächliche Wirkkonzentration. Nach SLAUNWHITE (29) ist nur der Anteil der Hormone biologisch aktiv, der frei, nicht an Proteine gebunden, im Blut zirkuliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Ausmaß der Proteinbindung von Testosteron im Kindesalter bei beiden Geschlechtern zu bestimmen und eventuelle Veränderungen dieser Bindungsverhältnisse im Laufe der Entwicklung festzustellen. Mit den ermittelten Normwerten sollten die Werte von Jungen mit Pubertätsgynäkomastie und von Mädchen mit Pubertas praecox verglichen werden.

Als Meßmethode wurde die Gleichgewichtsdialyse nach FOREST et al. (11) gewählt. Die verwendete Versuchsanordnung mit speziellen, sehr kleinen Dialysekammern ermöglicht die einfache Durchführung der Dialyse mit kleinen Plasmavolumina. Das Ergebnis dieser Messung gibt an, wieviel Prozent der totalen Konzentration des Hormons im Plasma an Protein gebunden ist. Hieraus läßt sich leicht der freie, biologisch aktive Anteil errechnen. Die direkte Bestimmung der absoluten Menge des freien Plasma-Testosterons ist derzeit noch nicht möglich. Indirekt ließe sich diese Größe jedoch aus der Konzentration des totalen Testosterons und dem Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse ermitteln. Doch wurde hierauf in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da gerade in den niedrigen Konzentrationsbereichen vor der Pubertät die Konzentrationsbestimmung ungenaue Ergebnisse liefert, deren

rechnerische Kombination mit den Ergebnissen der Dialyse nur zu unsicheren Werten führen würde. Außerdem konnte wegen des relativ großen Plasmabedarfs nicht bei allen Kindern die Bestimmung der Testosteronkonzentration durchgeführt werden.

Albumin bindet mit großer Kapazität Testosteron wie auch andere Steroidhormone (1,22), doch ist diese unspezifische Bindung so schwach, daß sie kaum einen Einfluß auf die biologische Aktivität der Hormone hat (8). Das wichtigste Protein, durch welches Testosteron im Plasma gebunden wird, ist das Sexualhormon bindende Globulin (SHBG). Seine Affinität ist am stärksten gegenüber den Androgenen, Dihydrotestosteron und Testosteron, schwächer gegenüber den Östrogenen (22). Das Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse, d.h. das Verhältnis von freiem zu totalem Hormon, wird im wesentlichen durch die Konzentration des SHBG bestimmt.

In neuerer Zeit wurde eine Methode zur Bestimmung der Bindungskapazität des SHBG mit Hilfe einer Polyacrylamid-Electrophorese entwickelt (13). Die Ergebnisse sind sehr zuverlässig und gut reproduzierbar. Die Methode ist aber apparativ aufwendig und erlaubt wie die Gleichgewichtsdialyse nur einen indirekten Rückschluß auf die aktuelle Konzentration der biologisch aktiven Sexualhormone.

Die Bedeutung des SHBG ist noch unklar. Es ist auch noch unsicher, ob für eine normale Funktion und Regulation der Sexualhormone Sexualhormon bindendes Globulin überhaupt notwendig ist. Ein angeborener Mangel anderer Transportglobuline wie der des Thyroxin bindenden Globulins oder des Corticosteroid bindenden Globulins (Transcortin) führt nicht zu klinisch auffälligen Stö-

rungen (14). Der Regulationsmechanismus für diese Hormone läuft in solchen Fällen mit stark erniedrigten totalen Hormonkonzentrationen ab, sodaß die nicht proteingebundene Hormonmenge normal hoch ist.

Androgene und Östrogene beeinflussen in unterschiedlicher Weise die Kapazität des SHBG. Während Testosteron zu einer Verminderung des SHBG führt, verursachen Östrogene eine deutliche Erhöhung (33, 23). Unter der Gabe von Östradiol und besonders ausgeprägt in der Gravidität steigt die Bindungskapazität von SHBG an (23). Entsprechend einer Hypothese von BURKE und ANDERSON (8) dient das SHBG der Regulation des Verhältnisses von freiem Androgen zu freiem Östrogen. Wegen der höheren Affinität des SHBG zu Testosteron hat ein Östrogen induzierter Anstieg der SHBG-Kapazität eine ausgeprägtere Wirkung auf die Bindung und Inaktivierung von Testosteron als auf die von Östradiol. Das Ergebnis des Anstiegs der SHBG-Kapazität ist eine Verschiebung des Verhältnisses von freiem Testosteron zu freiem Östradiol zugunsten des freien Östradiols (30, 33). Auf der anderen Seite verschiebt die durch die Gabe von Androgenen hervorgerufene Verminderung der SHBG-Kapazität das Gleichgewicht zugunsten des freien Testosterons. Das bedeutet, daß Östradiol und Testosteron ihre biologische Wirksamkeit durch ihren spezifischen Effekt auf die SHBG-Kapazität verstärken (8).

Unsere Untersuchungen ergaben bei gesunden Jungen vom 2. bis 16. Lebensjahr ein deutliches Absinken des prozentual gebundenen Anteils des Testosterons im Plasma mit zunehmendem Alter. Bei den Jungen steigt nach der Adrenarche die absolute Plasmakonzen-

tration des Testosterons im Verlauf der Pubertät auf das mindestens Zwanzigfache (12). Die deutliche Zunahme des totalen Plasmatestosterons verursacht eine Verminderung der SHBG-Produktion und führt damit zu einer Verminderung der SHBG-Kapazität. Das bedeutet, daß es in dieser Periode zu einer Abnahme des proteingebundenen Testosterons kommt und entsprechend die absolute Menge des freien, biologisch aktiven Testosterons zunimmt.

Bei gesunden 2- bis 12jährigen Mädchen dagegen ist keine Änderung der Bindungsverhältnisse von Testosteron mit steigendem Alter feststellbar. Der Anstieg des Gesamttestosterons im Plasma während der weiblichen Pubertät fällt wesentlich geringer aus als während der männlichen (12), gleichzeitig erhöhen sich aber die absoluten Östrogenspiegel im Plasma bei Mädchen wesentlich stärker als bei Jungen (3, 4). Bei den Mädchen konkurrieren während der Pubertät deutlich ansteigende Östradiolspiegel mit - verglichen mit den Jungen - nur geringfügig ansteigenden Testosteronspiegeln um Bindungsstellen am Protein. Der biologische Einfluß des Testosterons auf das SHBG überwiegt den des Östradiols weit (21). Offensichtlich verdrängt das Testosteron wegen seiner größeren Affinität zum Protein gerade soviel Östradiol, daß sich die Proteinbindung des Testosterons während der weiblichen Pubertät für unsere Methode nicht meßbar ändert.

Die Proteinbindung des Testosterons beträgt bei beiden Geschlechtern im Mittel etwa 96 %. Die aus unserer Untersuchung hervorgehenden Normbereiche für die Proteinbindung von Testosteron sind so breit und überlappen sich während der gesamten Entwicklungsperiode, daß trotz des unterschiedlichen Verhaltens der

Regressionsgeraden ein statistischer Vergleich der Werte beider Geschlechter nicht zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Proteinbindung von Testosteron führt. Natürlich ergeben sich geschlechtsspezifische Unterschiede, wenn man die absoluten Testosteronspiegel im Lauf der Pubertät vergleicht und daraus die Menge des freien Hormons abschätzt. Beim Erwachsenen fanden FOREST et al. (12) für Männer prozentual mehr freies Androgen im Blut als bei Frauen, was nach der Hypothese von BURKE und ANDERSON (8) auf den negativen Einfluß der hohen freien Androgenspiegel auf die SHBG-Kapazität zurückzuführen ist.

Jungen mit Pubertätsgynäkomastie unterschieden sich von gesunden Jungen weder in ihren absoluten Testosteronspiegeln noch in ihren absoluten Östrogenspiegeln (2, 15, 20). Nach Untersuchungen von BIDLINGMAIER und KNORR (2) sowie von LEE (20) liegen nahezu alle Werte der Sexualhormonkonzentrationen der betroffenen Jungen im Normbereich der entsprechenden Entwicklungsstufe. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Testosteron und Östradiol ist ebenfalls nicht zu beobachten. Auch aus unseren Untersuchungen ergab sich kein pathologischer Befund. Eine signifikante Verschiebung der Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenen Testosteron bei Gynäkomastie im Vergleich zu normalen Jungen war nicht feststellbar.

Die Ursache für die relativ häufige Pubertätsgynäkomastie ist noch unklar. Viele mögliche Ursachen sind bisher untersucht worden (2, 3, 4, 5, 20, 35): Die Gonadotropine, das Prolactin, die Östrogene und die Androgene im Urin und im Blut, sowie das Verhältnis von Androgenen zu Östrogenen. Alle diese Parameter

erwiesen sich als normal. Schließlich wurde eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen freiem und gebundenen Östradiol mit Vermehrung der freien Hormonkonzentration diskutiert (6). Doch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist auch eine solche Störung als Ursache für das Auftreten der Gynäkomastie bei Jungen in der Pubertät unwahrscheinlich.

Bei Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox fanden wir geringfügig erhöhte Werte prozentual gebundenen Testosterons und damit eine Verminderung des freien Testosteronanteils gegenüber gesunden Mädchen. Diese relativ stärkere Proteinbindung des Testosterons läßt sich durch eine Erhöhung der SHBG-Kapazität erklären. Ursache einer gesteigerten SHBG-Kapazität ist nach BURKE und ANDERSON (8) vermehrt zirkulierendes Östradiol. Tatsächlich fanden BIDLINGMAIER et al. (5), daß bei Patientinnen mit Pubertas praecox die totalen Plasma-Östradiolspiegel im Mittel deutlich erhöht sind, allerdings fluktuieren sie beträchtlich. Phasen normaler Plasmaspiegel wechseln mit Phasen stark erhöhter Spiegel ab.

G. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurde bei 74 gesunden Jungen und 62 gesunden Mädchen während der Kindheit und der Pubertät der an Protein gebundene Anteil von Testosteron im Plasma bestimmt, um daraus auf den freien, biologisch aktiven Anteil des totalen Plasma-Testosterons schließen zu können. Ein deutlicher Abfall des prozentual gebundenen Anteils bis zur Adoleszenz war bei Jungen festzustellen, während bei Mädchen das Verhältnis von proteingebundenem zu totalem Testosteron im selben Zeitraum nahezu gleich blieb.

Dieser Unterschied zwischen Jungen und Mädchen war statistisch jedoch nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob eine Verschiebung des Bindungsgleichgewichts zwischen totalem und freiem Testosteron bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie und bei Mädchen mit Pubertas praecox vorliegt, wurden die Bindungswerte von 20 Jungen mit Pubertätsgynäkomastie und 30 Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox mit den Werten gleichaltriger gesunder Probanden verglichen.

Bei den betroffenen Jungen konnte keine Veränderung der Proteinbindung gegenüber gesunden Jungen gefunden werden. Bei Mädchen mit Pubertas praecox ist der an Protein gebundene Anteil des Testosterons im Plasma gegenüber gesunden Mädchen geringfügig erhöht, was auf den positiven Einfluß des Östradiols auf die SHBG-Kapazität zurückgeführt werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Baulieu, E.E., Raynaud, J.P., and Milgrom, E.:
Measurement of steroid binding protein, Acta Endocrinol.
Suppl. 147: 104 - 122 (1970)
2. Bidlingmaier, F., Knorr, D.:
Plasma testosterone and estrogens in pubertal gynecomastia.
Z. Kinderheilkunde 115: 89 - 94 (1973)
3. Bidlingmaier, F., Wagner-Barnack, M., Butenandt, O.,
Knorr D.:
Plasma estrogens in childhood and puberty under physiologic
and pathologic conditions.
Pediat. Res. 7: 901 (1973)
4. Bidlingmaier, F., Versmold, H., Knorr, D.:
Plasma estrogens in newborns and infants. In: M.G. Forest,
J. Bertrand (Eds.): Endocrinologie sexuelle de la période
périnatale 299-314, Editions J.N.S.E.R.M., Vol.32, Paris 1974
5. Bidlingmaier, F., O. Butenandt, and D. Knorr:
Plasma gonadotropins and estrogens in girls with idiopathic
precocious puberty. Pediat. Res. 11: 91 - 94 (1977)
6. Bidlingmaier, F., Knorr, D.:
Oestrogens - Physiological and clinical aspects.
S. Karger Verlag, Basel (1978)

7. Bruining, G.J., Smith, J., Forbes, G.B., Bergink, E.W., Wittliff, J.L.:
Alterations in plasma testosterone and sex hormone binding globulin during puberty (Abstract), *Pediat. Res.* 10: 878 (1976)
8. Burke, C.W., and D.C. Anderson:
Sex-hormone-binding globulin is an estrogen amplifier.
Nature 240: 38 (1972)
9. "Dianorm" Fa. Bachofer, 7411 Reutlingen
10. Betriebsanleitung Dianorm, Fa. Bachofer, 7411 Reutlingen
11. Forest, M.G., M.A. Rivarola, and C.J. Migeon:
Percentage binding of testosterone, androstenedione and dehydroisoandrosterone in human plasma.
Steroids 12: 323 (1968)
12. Forest, M.G., A.M. Cathiard, and J.A. Bertrand:
Total and unbound testosterone levels in newborn and in normal and hypogonadal children: Use of a sensitive radio-immuno assay for testosterone.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 1132 (1973)
13. Georges, P., Brijawi, A., Evain, D., Savage, M., Chaussain, J.L.:
Binding capacity of serum testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) in males: variation with age and pathological conditions (Abstract). *Pediat. Res.* 10: 885 (1976)

14. Heinonen, O.P., Lamberg, B.-A., Virtamo, J.:

Inherited decrease of the binding capacity of thyroxine-binding globulin (TBG).

Acta Endocrinol. Metab. 64: 171 - 180 (1970)

15. Knorr, D.:

Die Bestimmung von Testosteron im Harn und im Plasma durch Gaschromatographie mit Elektronenempfang-Detektor, In: Methoden der Hormonbestimmung, Breuer, Krüskemper (Hrsg.), Thieme Verlag

16. Knorr, D.:

Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen bei 500° C.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9: 175 (1971)

17. Knorr, D., Bidlingmaier, F., Butenandt, O., Fendel, H., Ehrt-Wehle, R.:

Plasma testosterone in male puberty. I. Physiology of plasma testosterone. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 75: 181 - 194 (1974)

18. Korth-Schutz, S., L.S. Levine, and M.J. New:

Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 42: 117 (1976)

19. Labhart, A.:

Klinik der inneren Sekretion,

2. Aufl. S. 500. Springer Verlag 1971

20. Lee, P.A.:

The relationship of concentrations of serum hormones to pubertal gynecomastia. J. Pediat. 86: 212 - 215 (1975)

21. Mercier-Bodard, C., Alfsen, A., Baulieu, E.-E.:
Sex steroid binding plasma protein (SBP); in Diczitalusy
Steroid assay by protein binding; pp 204 - 224
Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 147 (1970)
22. Murphy, B.E.P.:
Further studies of the specificity of the sex hormone-
binding globulin of human plasma. Steroids 16: 791 - 798 (1970)
23. Pearlman, W., O. Crépy, and M. Murphy:
Testosterone - binding levels in the serum of women during
the normal menstrual cycle, pregnancy, and the post-partum
period. J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 1012 (1967)
24. Pirke, K.M., Doerr, P.:
Age related changes and interrelationship between plasma
testosterone, estradiol and testosterone binding globulin
in normal adult males. Acta Endocrinol. 74: 792 (1973)
25. Radfar, N., Kitti Ansusingha, and F.M. Kenny:
Circulating bound and free estradiol and estrone during
normal growth and development and in premature thelarche
and isosexual precocity. J. Pediat. 89: 719 (1976)
26. Root, A.W.:
Endocrinology of puberty, J. Pediat. 83: 1 (1973)
27. Rudel, B.T., Duignan, N.M., Lindon, D.R.:
A rapid method for the measurement of sex hormone binding
capacity of sera, Coin. Chim. Acta. 55: 165 - 178 (1974)

28. Sizonenko, P.C. and Paunier, L.:
Hormonal changes in puberty. III. J. Clin. Endocrinol.
Metab. 41: 894 (1975)
29. Slaunwhite, W.R., Jr. in:
Hormones in human plasma. Editor, H.N. Antoniades, Little,
Brown and Co., Boston, 482 (1960)
30. Southren, A.L., Gordon, G.G., Tochimoto, S.:
Further study of factors affecting the metabolic clearance
rate of testosterone in man. J. Clin. Endocrinol. 28:
1105 - 1112 (1968)
31. Tanner, J.M.:
Wachstum und Reifung des Menschen.
Stuttgart: Thieme 1962
32. Tulchinsky, D., and Chopra, I.J.:
Competitive ligand-binding assay for measurement of the
sex hormone binding globulin (SHBG).
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 873 (1973)
33. Vermeulen, A., Verdonck, L., van der Straeten, M., Orie, N.:
Capacity of the testosterone-binding globulin in human
plasma and influence of specific binding of testosterone
on its metabolic clearance rate.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29: 1470 - 1480 (1969)
34. Vermeulen, A., Stoica, T., Verdonck, L.:
The apparent free testosterone concentration, an index of
androgenicity.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 759 - 767 (1971)

35. Wieland, R.G.:

Pituitary-gonadal function in pubertal gynecomastia.

J. Pediat. 79: 1002 - 1004 (1971)

Lebenslauf

Name: Max Grünewald

Geburtsdatum: 29. April 1947

Geburtsort: München

Wohnort: 8052 Moosburg, Herrnstr. 14

Eltern: Vater: Paul Grünewald, Dipl Ing., München
Mutter: Gertraud Grünewald, Hausfrau,
München

Ehefrau: Margot Grünewald, geb. Mayer,
Apothekerin in Moosburg

Volksschule: 1953 - 1957 Alfons-Fischer Volksschule,
München

Gymnasium: 1957 - 1966 Wittelsbacher Gymnasium,
München

Abitur: 1966

Bundeswehr: 1966 - 1968

Pharmazie-Praktikum: 1968 - 1970 Bahnhof-Apotheke in München

Pharmazie-Studium: 1971 - 1974 an der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München
Approbation als Apotheker 1974

Medizin-Studium: Beginn: Sommer-Semester 1974 an der
Ludwig-Maximilians-Universität
Physikum: April 1975
1. Med. Staatsexamen April 1976
2. Med. Staatsexamen April 1978

Besonderen Dank schulde ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-
Biochem. F. Bidlingmaier, Leiter des klinischen Labors der
Universitäts-Kinderklinik für die tatkräftige Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Betke und Herrn
Prof. Dr. med. Knorr für die Überlassung des Arbeitsplatzes
im Hormonlabor der Kinderklinik der Universität.

Bedanken möchte ich mich bei den med. techn. Assistentinnen
des Hormonlabors, bei Frau A. Baumann, Frau A. Diepolder,
Frau E. Grove, Frau A. Kapp, Frau M. Wagner und Frau C. Wohl-
fahrth für die Zusammenarbeit.

